

FR 2453875

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

002561100

WPI Acc No: 1980-79124C/198045

**Long-acting anticoagulant heparin fraction - isolated from heparin prepn.
of mol. wt. 5000-50000 by chromatography on an anion exchange resin**

Patent Assignee: CHOAY SA (LCHO)

Inventor: BERTRAND H; MAMAN M; SACHE E

Number of Countries: 004 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 3014076	A	19801030				198045 B
GB 2051103	A	19810114				198103
FR 2453875	A	19801211				198106
IT 1141273	B	19861001				198825

Priority Applications (No Type Date): GB 809585 A 19800321; GB 7912691 A
19790411; GB 7924816 A 19790717

Abstract (Basic): DE 3014076 A

New heparin fraction with anticoagulant properties is obtainable from a heparin prepn. with mol. wts. of 5000-50000. Aq. buffered soln. of the prepn. of pH 6.5, contg. a salt which imparts to the soln. an ionic strength less than that of a corresp. 0.6M buffered NaCl soln., is contacted with an anion-exchange resin; heparin fractions are eluted from the resin with the abbre (heparin-free) buffered soln. having an ionic strength less than that of 0.6M buffered NaCl soln.; and the fraction retained on the resin is eluted with a corresp. buffered soln. having an ionic strength which is higher than that of 0.6M buffered NaCl soln.

New fraction has anticoagulant activity which is 3-5 times higher than that of standard heparin and modified elimination kinetics giving a greatly prolonged anticoagulant effect. Fraction is indicated for parenteral use in hypercoagulability states. Inhalation solns. are also of use in the treatment of headaches.

Title Terms: LONG; ACT; ANTICOAGULANT; HEPARIN; FRACTION; ISOLATE; HEPARIN;
PREPARATION; MOLECULAR; WEIGHT; CHROMATOGRAPHY; ANION; EXCHANGE; RESIN

Derwent Class: A91; B04

International Patent Class (Additional): A61K-031/72; C08B-037/10;
C08L-005/10

File Segment: CPI

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 453 875

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 08228

(54) Fractions d'héparine présentant des activités anticoagulantes accrues, leur préparation et leurs utilisations thérapeutiques.

(51) Classification internationale (Int. Cl. 7). C 08 L 5/10; A 61 K 31/725.

(22) Date de dépôt..... 11 avril 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *Grande-Bretagne, 11 avril 1979, n° 79 12691; 17 juillet 1979, n° 79 24816; 21 mars 1980, n° 80 09585.*

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 45 du 7-11-1980.

(71) Déposant : CHOAY SA, résidant en France.

(72) Invention de : Edgar Sache, Michel Maman et Henri Bertrand.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Plasseraud,
84, rue d'Amsterdam, 75009 Paris.

Fractions d'héparine présentant des activités anticoagulantes accrues, leur préparation et leurs utilisations thérapeutiques.

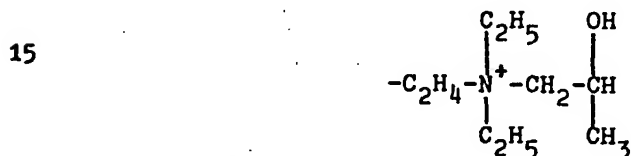
La présente invention se rapporte à des fractions d'héparine présentant des propriétés anticoagulantes considérablement accrues, à leur préparation et à leurs utilisations thérapeutiques.

5 Ces fractions d'héparine peuvent être obtenues à partir de préparations purifiées d'héparine du commerce, en particulier de celles convenant pour la thérapeutique selon les normes actuelles et qui comprennent des poids moléculaires d'environ 5.000 à 40.000 ou même d'environ
10 50.000, par mise en contact d'une résine anionique avec une solution d'une telle préparation d'héparine dans une solution aqueuse tamponnée à un pH de 6,5 à 7,5 et contenant un sel qui lui confère une force ionique inférieure à celle d'une solution tamponnée correspondante de NaCl 0,6 M, par
15 élution, à partir de ladite résine, des fractions d'héparine éluables par ladite solution tamponnée exempte d'héparine et présentant une force ionique inférieure à celle de ladite solution tamponnée de NaCl 0,6 M, puis de l'élution de la fraction encore fixée à l'aide d'une solution
20 tamponnée correspondante présentant une force ionique au moins égale et de préférence supérieure à celle de ladite solution tamponnée de NaCl 0,6 M.

Les résines anioniques qu'on préfère pour la préparation des fractions selon l'invention sont celles qui
25 comprennent un squelette de cellulose ou de dextrane et qui portent des groupes aminoalkyle ou aminohydroxyalkyle, et par exemple celles énumérées ci-après.

Les fractions d'héparine selon l'invention qui, comme on le verra ci-après, présentent de fortes propriétés anticoagulantes, se caractérisent donc en ce qu'elles peuvent
30 être fixées sur la résine anionique définie ci-dessus et ne sont pas éluables à l'aide d'une solution de NaCl tamponnée telle que définie ci-dessus, ayant un pH de 6,5 à 7,5 et une force ionique inférieure à celle d'une solution tamponnée de NaCl 0,6 N.
35

Ces fractions peuvent être obtenues en particulier (ou sont pratiquement les mêmes que celles qu'on peut obtenir) - conformément à un premier mode de réalisation préféré de l'invention - à partir de 10 ml d'une solution de départ contenant 1 g d'héparine du commerce dans une solution tamponnée (phosphate : 0,05 M ; pH : 6,8 ; 0,4 M en NaCl) en versant ces 10 ml de solution sur une colonne d'une résine (de hauteur : 28 cm ; diamètre : 2 cm) équilibrée avec le même tampon, cette résine ayant un squelette de cellulose ou de dextrane et portant des groupes anioniques tels que des groupes diaminoéthyle de structure $-C_2H_4\overset{+}{N}(C_2H_5)_2$ ou des groupes diéthyl-2-hydroxypropylammonium de structure :



avantageusement sur les résines existant dans le commerce sous les marques "DEAE-SEPHACEL", "QAE-SEPHADEX", "DEAE-CELLULOSE", ou "TEAE-CELLULOSE", cette résine étant équilibrée par le même tampon, en soumettant cette solution d'héparine de départ à développement chromatographique à l'aide de la même solution tamponnée à une vitesse d'élution de 36 ml/h à une température de 4°C, en séparant et en rejetant les 500 premiers ml de liquide élué puis en augmentant progressivement la concentration du NaCl (avantageusement de manière à augmenter à peu près la concentration en NaCl de 0,4 à 1,4 M au cours de l'élution des 800 ml suivants environ de la solution éluee) et en recueillant les fractions d'héparine recherchées contenues dans celles de ces fractions éluées qui présentent une concentration en NaCl supérieure à 0,65 M, et de préférence comprise entre 0,70 et 0,90 M environ.

Selon un autre mode de réalisation apprécié de l'invention, ces fractions peuvent également être obtenues (ou sont pratiquement identiques à celles qu'on peut obtenir) à partir de 30 ml d'une solution de départ contenant 10 g d'une héparine du commerce (50 mM en tris; azo-

thhydrate de sodium : 0,02 % ; pH 7,0, à une concentration molaire initiale de NaCl de 0,4 M) en versant ces 30 ml de solution sur une colonne de résine portant des groupes anioniques - semblable ou identique aux résines mentionnées ci-dessus - (diamètre : 18 cm ; hauteur : 6,8 cm), ladite résine étant équilibrée par le tampon ci-dessus, en soumettant cette solution d'héparine de départ à développement chromatographique à l'aide de la même solution tamponnée à une vitesse d'élution de 75 ml/h à une température de 4°C, en séparant et en rejetant les 300 premiers ml de liquide élué puis en augmentant progressivement la concentration en NaCl de 0,4 M à 1,0 M à une vitesse telle qu'on atteigne la limite supérieure 24 heures plus tard, et en recueillant les fractions d'héparine recherchées contenues dans les fractions d'héparine éluées présentant une concentration en NaCl supérieure ou égale à 0,55 M et de préférence à 0,59 M.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, ces fractions peuvent également être obtenues (ou sont pratiquement identiques à celles qu'on peut obtenir) à partir d'une solution de départ de 650 mg d'héparine (présentant de préférence une activité d'environ 160 ± 20 UI/mg) dans 2 ml d'une solution aqueuse tamponnée (NaCl 0,3 M ; pH : 6,8) en versant ces 2 ml de solution sur une colonne "PHARMACIA" d' "ULTROGEL ACA 54" (de 2,6 x 100 cm) équilibrée par le même tampon, en soumettant cette héparine de départ à développement chromatographique à l'aide de la même solution tamponnée à une vitesse d'élution de 20 ml/h à une température de 4° C, en séparant le liquide élué en fractions successives de 5 ml et en recueillant les fractions d'héparine recherchées qui sont contenues dans les fractions allant de la 53ème à la 86ème de ces fractions de 5 ml séparées.

On obtient également (ou on peut obtenir) des fractions plus raffinées d'héparine selon l'invention par une combinaison des procédés décrits ci-dessus, et par exemple en recueillant les "fractions d'héparine recherchées" de la filtration chromatographique de l'ULTROGEL, comme décrit dans le procédé mentionné en dernier en séparant ces fractions d'héparine de l'éluant correspondant, par exemple

par précipitation à l'aide d'un alcool, en les réintroduisant dans une solution tamponnée du type utilisé dans les opérations décrites ci-dessus consistant à mettre en contact une telle solution tamponnée avec une résine anionique, selon l'un quelconque des modes de réalisation décrits ci-dessus, pour récupérer les fractions séparées d'après le gradient de NaCl décrit et qui sont contenues dans les fractions éluées présentant une concentration en NaCl - soit supérieure à 0,65 M, de préférence à une concentration en NaCl de 0,70 à 0,90 M, selon le premier mode de réalisation préféré décrit ci-dessus, - soit supérieure à 0,55 M, de préférence à 0,59 M, selon le second mode de réalisation apprécié.

Naturellement, il entre également dans le cadre de l'invention d'inverser les deux séparations successives décrites ci-dessus (c'est-à-dire de fractionner d'abord sur la résine DEAE-SEPHACEL ou une résine analogue, puis de séparer sur ULTROGEL).

Les fractions d'héparine selon l'invention sont également celles qui, en fractionnant des héparines du commerce par une technique quelconque, et particulièrement celles décrites ci-dessus, présentent une activité maximale dans l'essai *in vitro* consistant à mesurer la diminution de la vitesse d'hydrolyse du substrat S-2222 (benzoyl-isoleucine-acide glutamique-glycine-arginine-p-nitranilide, HCl) par le facteur X activé (facteur Xa) lui-même obtenu par activation du facteur X au moyen d'un activateur de facteur X en présence de plasma (agissant à la fois comme source du facteur X et comme source de l'antithrombine III) et en présence des fractions d'héparine soumises aux essais. L'activateur utilisé est avantageusement le produit vendu dans le commerce sous la marque STYPVEN, mis dans une solution 0,5 M de CaCl_2 .

Ces fractions préférées d'héparine peuvent également comprendre en partie au moins celles qui présentent une activité maximum dans l'essai *in vitro* comprenant la mesure de la diminution de la vitesse d'hydrolyse du substrat chromogène S-2238 (H-D-phénylalanine-L-pipécolyl-L-arginine-p-nitranilide, di-HCl) par la thrombine en présence

de plasma (agissant comme source de l'antithrombine III) et des fractions d'héparine soumises aux essais.

Les substrats S-2238 et S-2222 existent dans le commerce (produits de la firme suédoise KABI Company).
5 Ce sont des substrats chromogènes. Leur vitesse ou degré d'hydrolyse est mesuré par spectrophotométrie.

Lorsqu'on a utilisé les techniques de fractionnement décrites ci-dessus, sur les gels ULTROGEL et les résines DEAE-SEPHACEL ou analogues, on a constaté que les
10 fractions les plus actives dans les essais *in vitro* dont on vient de parler étaient contenues dans les volumes élués spécifiés ci-dessus.

Dans la technique de fractionnement sur ULTROGEL, ces fractions sont plus particulièrement celles qui
15 sont éluées avec les fractions de 5 ml telles que définies ci-dessus allant d'environ la 58ème-68ème à la 76ème-80ème (ces fractions, groupées ensemble, sont appelées "fraction LP₂").

Les fractions d'héparine préférées sont celles
20 qui présentent l'activité maximale par rapport au substrat S-2222 même si elles ne contiennent pas les fractions qui présentent l'activité maximale sur le substrat S-2238.

Par conséquent, les solutions d'héparine qui, dans la technique de fractionnement sur ULTROGEL décrite
25 ci-dessus, sont recueillies avec les fractions de 5 ml allant de la 53ème à la 58ème-60ème (les "fractions LP₁₂") appartiennent aux fractions d'héparine les plus appréciées selon l'invention. Ces fractions possèdent une haute activité anticoagulante qu'on peut mettre en évidence par la
30 technique thrombo-élastographique et les tests classiques antithrombine.

On a constaté que les fractions d'héparine présentant l'activité maximale dans ces essais *in vitro* et qui peuvent également avoir une activité anticoagulante, telle
35 que mise en évidence par la technique thrombo-élastographique et par l'activité antithrombine, très supérieure à celle des héparines commerciales de départ - avaient des poids moléculaires moyens dans l'intervalle de 17.000 à 25.000, tels que déterminés par les durées de rétention mesurées dans la chromatographie liquide à haute performance
40

(avec un chromatographe "SPECTRA-PHYSICS 3500" sur colonnes de 250 x 9 mm garnies de silice en granules de 10 à 100 microns commercialisée sous la marque "LICHROSPHER", avec élution par Na_2SO_4 0,02 M à la vitesse de 3 ml/mn), ces durées de rétention mesurées étant comparées à celles obtenues dans des conditions identiques d'élution avec des polystyrène-sulfonates de sodium présentant des poids moléculaires étalons de 1.600, 4.000, 6.500, 16.000, 31.000, 65.000 et 88.000 respectivement.

Les fractions préférées selon l'invention sont celles qui présentent une activité inhibitrice spécifique à l'égard du facteur Xa (activité spécifique antiFXa) d'au moins 300 u/mg, de préférence d'au moins 450 u/mg et même de préférence d'au moins 500 u/mg de la susdite fraction d'héparine. Cette activité spécifique antiFXa est mesurée *in vitro* par une technique mettant en oeuvre le substrat S-2222.

Parmi ces fractions préférées, on trouve celles qui présentent *in vitro* une "activité spécifique antithrombine" exprimée en u/mg d'héparine, inférieure à "l'activité spécifique antiFXa" lorsqu'on mesure ladite "activité spécifique antithrombine" comme décrit ci-après par une technique mettant en oeuvre le substrat chromogène S-2238. "L'activité spécifique antiFXa" est avantageusement supérieure à 500 u/mg alors que "l'action spécifique antithrombine" est inférieure à 400 u/mg.

On a constaté que les fractions d'héparine isolables comme décrit ci-dessus avaient une activité anticoagulante globale accrue, telle que déterminée par le temps de thrombine et le temps de Céphaline-Kaolin, mesurés à la fois *in vitro* et *in vivo* et par la technique thromboélastographique, comme décrit dans "Biologie des hémorragies et des thromboses" de G. Raby, Masson Editeur, Paris 1966, pages 185 à 188. Elles sont particulièrement efficaces sur la cinétique de coagulation, telle qu'exprimée par l'augmentation des paramètres "r" et "r+k", mesurés selon cette technique thromboélastographique.

On a constaté que les fractions selon l'invention donnaient des diagrammes d'électrophorèse différents de celui de l'héparine de départ : en particulier, les mobilités élec-

trophorétiques de leurs composants sont nettement supérieures à celles de l'héparine du commerce dans des conditions déterminées, en particulier lorsqu'on soumet leurs solutions dans l'acétate de baryum 0,1 M, pH 5,8, à électrophorèse de 15 heures sous une intensité de 1 mA, sur des bandes d'acétate de cellulose, en particulier les bandes d'acétate de cellulose du commerce MICROPHOR.

Pour ce qui concerne les autres propriétés particulières des nouvelles fractions d'héparine selon l'invention, on a en outre constaté que :

- elles étaient fixées pratiquement en totalité par l'antithrombine III, en particulier l'antithrombine III immobilisée ;
- elles inhibaient en partie au moins les facteurs sanguins XI et XII qui, comme le sait, constituent le début de la cascade de réactions enzymatiques qui culmine dans la coagulation du sang ;
- elles ne sont pas inhibées fortement par le facteur IV des plaquettes, contrairement à l'héparine normale,
- leurs propriétés anticoagulantes représentent de 2,5 à 5 fois celles de l'héparine de départ dans des essais *in vivo* ;
- les groupes glucosamine qu'elles contiennent semblent être en partie seulement à l'état de sulfate de N-glucosamine, les autres groupes glucosamine étant sous la forme de groupes N-acétylglucosamine, comme le montrent les mesures de résonance magnétique nucléaire.

On a également constaté qu'elles étaient exemptes de l'un des effets secondaires essentiels fréquemment rencontrés avec les héparines connues. Plus précisément, on a constaté qu'elles n'avaient pas d'action thrombocytopénique sur le sang de patients sensibilisé à l'héparine habituelle du commerce et manifestant ce syndrome lorsqu'on leur administre l'héparine en question.

Les fractions d'héparine selon l'invention peuvent être obtenues selon d'autres modes de réalisation différant essentiellement de ceux décrits ci-dessus en ce qu'ils n'exigent pas l'établissement d'un gradient ré-

gulier de concentration du NaCl ou d'un composant analogue, depuis une basse concentration jusqu'à une forte concentration.

En effet, les fractions d'héparine selon l'invention peuvent être obtenues par un procédé discontinu
5 apte à faciliter les manipulations de grandes quantités de produits de départ et par conséquent de procéder à des fractionnements sur de grandes quantités. Elles peuvent également être obtenues par des techniques chromatographiques sur des colonnes de grandes dimensions de résine
10 anionique, avec une série d'éluants tamponnés successifs à des concentrations différentes en NaCl, en partant de la concentration la plus basse jusqu'à la concentration la plus forte mais avec des variations de concentration réalisées par paliers et non pas sous la forme de gradient.

On a constaté de manière fondamentale que, quel
15 que soit le mode opératoire employé, la fraction selon l'invention est essentiellement contenue dans l'éluat qu'on peut obtenir en mettant la résine en contact avec une solution d'éluant dont la concentration en NaCl
20 est au moins 600 mM, après contact préalable de la résine avec une solution de l'héparine de départ à fractionner sous la forme de solution tamponnée à faible teneur en NaCl, et séparation des fractions d'héparine qu'on peut éluer avec des solutions de NaCl allant
25 pratiquement jusqu'à la concentration 600 mM.

On peut utiliser également des solutions tamponnées à des concentrations en NaCl nettement supérieures à la limite minimum indiquée ci-dessus (650 mM) et par exemple à des concentrations 800 mM ou même 1.000 mM.

Naturellement, on peut remplacer le chlorure
30 de sodium par de nombreux autres sels dont l'utilisation est compatible avec l'utilisation finale des fractions d'héparine selon l'invention, en particulier en thérapeutique, à condition que ces sels permettent d'obtenir des solutions
35 aqueuses ayant la force ionique correspondante. Comme exemples de tels sels, on citera le chlorure de potassium, le sulfate d'ammonium, les phosphates alcalins, etc.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter ; dans ces exemples, les indications de parties et de % s'entendent en poids sauf mention contraire ; on décrira en premier différents modes de préparation des fractions selon l'invention, puis les propriétés particulières de ces fractions. Toutefois, avant ces exemples, on rappellera les modes opératoires employés dans les différents essais.

A) Dosage de l'héparine dans des fractions éluées successives.

10 Concentration en héparine :

On a déterminé la concentration en héparine dans les diverses fractions chromatographiques par mesure polarimétrique à l'aide du polarimètre Perkin-Elmer modèle 241 (Uberlingen, RFA) avec lecture à 365 nm (raie du mercure) ;

15 $[\alpha]_{365\text{ nm}}^{25^\circ\text{C}} = 139$ pour les produits du commerce mentionnés ci-dessus. A partir de l'équation classique $[\alpha]_{\lambda}^t = \frac{100\alpha}{1.c}$, dans laquelle $[\alpha]_{\lambda}^t$ est la rotation spécifique à la longueur d'onde et à la température données, $[\alpha]$ la rotation observée, 1 la longueur en dm du trajet de la lumière dans la solution soumise à la mesure et c la concentration du soluté en g pour 100 ml, on tire la relation $[\alpha]/0,139 = \text{concentration du soluté en héparine en mg.ml}^{-1}$.

20

B) Mesure de l'activité de l'héparine sur le substrat S-2222.

On mesure l'effet d'inhibition exercé sur l'activité du facteur X activé (FXa) sur le substrat S-2222.

25

1°) Préparation des réactifs.

a) Préparation d'une solution du substrat S-2222.

On dissout 25 mg du substrat dans 8,5 ml d'eau bidistillée sous agitation à l'agitateur magnétique. Lorsqu'elle n'est pas contaminée par des micro-organismes,

30 cette solution est stable pendant 6 mois à 4°C.

b) Préparation de la composition activatrice.

La composition activatrice est formée à partir des solutions obtenues comme décrit ci-après :

35

- on dissout 0,2 mg du produit vendu par la firme Wellcome (Grande-Bretagne) sous la marque STYPVEN (Russel Viper Venom (RVV)) dans 2 ml d'une solution de chlorure de sodium à 9 g/l (solution 1).;
 - 5 - on dissout 555 mg de CaCl_2 dans 10 ml d'eau distillée (solution 2) ;
 - on mélange 1 ml de la solution 1 avec 0,5 ml de la solution 2.
- Le mélange obtenu, qui forme la "composition activatrice",
10 est stable pendant au moins deux jours à 4°C.

c) Préparation du tampon (pH 8,4 à 25°C).

On forme une solution en partant de

	tris	: 6,1 g (50 mM)
15	Na_2EDTA	: 2,8 g (7,5 mM)
	NaCl	: 10,2 g (175 mM)
	eau distillée	: 800 ml

On règle le pH à 8,4 à 25°C par HCl 1N. On complète la solution à 1.000 ml par l'eau distillée.

20 d) Formation du "substrat tamponné".

On mélange 1 volume de substrat S-2222 (4 mM/l) avec 1 volume du tampon décrit ci-dessus. Le mélange est stable pendant au moins 3 heures à température ambiante.

25 e) Préparation d'une solution diluée de plasma humain (source de l'antithrombine III (AT III) et du facteur X).

On mélange 9 volumes de sang (sang mélangé d'au moins 10 donneurs normaux) avec 1 volume de solution de citrate de sodium à 0,1 mole/l. Le plasma est obtenu par
30 centrifugation à 2.000 g et 4°C pendant 20 mn. Il est congelé à -20°C.

On mélange 0,2 ml de ce plasma avec 9,8 ml du tampon au tris.

f) Préparation de la solution d'héparine à utiliser comme témoin comparatif : INTERNATIONAL REFERENCE STANDARD HEPARIN (en abrégé ci-après "Héparine témoin").

5 On prépare une solution de 0,1 mg de l'héparine témoin par ml de solution 0,15 M de NaCl. On complète 0,6 ml de cette solution à volume final de 10 ml par NaCl 0,15 M.

Dans une opération chromatographique, cette solution d'héparine est diluée de manière à obtenir un échantillon de 0,05 ml contenant environ 0,25 microgramme d'héparine, à soumettre à l'essai.

10

2°) Mode opératoire des essais.

Les essais sont effectués comme décrit ci-après :

15 a) On introduit 0,4 ml de plasma dilué dans une semi-micro-cuvette. On ajoute 0,2 ml de tampon au tris. On soumet le mélange à incubation de 2 mn à 37°C.

On ajoute ensuite 75 microlitres de la composition activatrice.

20 On mélange et on soumet à incubation de 60s à 37°C.

On ajoute 0,2 ml du substrat tamponné et on mélange.

On lit l'absorption à 405 nm par rapport à un témoin (1 ml du tampon correspondant).

25

" $\Delta A \text{ mn}^{-1}$ " représente l'augmentation par mn de la densité optique.

b) Dans un second essai, on ajoute 0,05 ml d'une solution de l'héparine témoin à une puissance connue en UI (unités internationales) à 0,4 ml de plasma humain dilué. On complète le mélange à 0,6 ml par du tampon au tris et on soumet à incubation de 2 mn à 37°C.

30

On ajoute 75 microlitres de la composition activatrice, on mélange et on lit l'absorption à 405 nm.

35 " $\Delta A' \text{ mn}^{-1}$ " est l'augmentation par mn de la densité optique.

c) On répète l'essai avec les fractions d'héparine à haute activité soumises aux essais. Ces dernières fractions sont ajustées grossièrement en quantité telle qu'on obtienne une valeur correspondante de " ΔA " mn^{-1} " de l'ordre de 50 % de la valeur " $\Delta A \text{ mn}^{-1}$ " obtenue avec le témoin tamponné.

La valeur (a) qui représente le degré d'inhibition du facteur Xa par 1 mg de l'héparine de titre connu est calculée par l'équation :

$$(a) = \frac{\Delta A - \Delta A'}{0,25} \times 1000$$

La valeur correspondante (a') pour la fraction d'héparine soumise à l'essai est donnée par l'équation :

$$(a') = \frac{\Delta A - \Delta A''}{\text{poids de l'échantillon d'héparine}} \times 1.000$$

et la puissance de l'héparine soumise à la mesure, en UI, est déduite par la formule :

$$\text{puissance de l'héparine soumise à la mesure} = \text{puissance de l'héparine témoin} \times \frac{a'}{a}$$

C) Mesure de l'activité de l'héparine sur le substrat S-2238
(par mesure de l'inhibition exercée sur l'activité de la thrombine à l'égard du substrat S-2238).

1°) Préparation des réactifs.

a) Préparation d'une solution du substrat S-2238.

On dissout 4,71 mg de ce substrat dans 10 ml d'eau bidistillée, formant ainsi une solution à 0,75 mM/l.

b) Préparation d'une solution de thrombine.

On dissout 5 mg de thrombine dans 25 ml d'une solution 0,15 M de NaCl. Si c'est nécessaire, on dilue 1,2 ml de cette solution au moment de la mesure à volume final de 10 ml par la même solution de NaCl.

c) Préparation du tampon (pH 8,4 à 25°C).

Ce tampon est le même que celui décrit ci-dessus sous B 1) e) ci-dessus.

d) Préparation d'un plasma de mouton.

On recueille du sang de mouton sur citrate (900 ml de sang (9 volumes) mélangés avec 100 ml de citrate de sodium 0,1 M).

5 Le plasma est obtenu par centrifugation de ce mélange à 2.000 g et 4°C pendant 20 mn.

On le congèle dans des fioles de 25 ml.

e) Préparation de la solution d'héparine témoin.

On prépare une solution de 0,1 mg de l'héparine
10 témoin par ml de NaCl 0,15 M. On complète 0,5 ml de cette solution à volume final de 10 ml par NaCl 0,15 M.

Dans une opération chromatographique, cette solution d'héparine est diluée de manière à obtenir un échantillon de 0,05 ml contenant environ 0,25 microgramme d'héparine, qu'on soumet à l'essai.

2°) Mode opératoire d'essai.

On mélange dans une semi-micro-cuvette (1 ml)
0,3 ml du tampon ci-dessus et 0,1 ml du plasma de mouton.

On ajoute 0,1 ml de la solution diluée de thrombine. On soumet le mélange à incubation à 37°C au bain-
20 marie pendant 2 mn.

On ajoute alors 0,3 ml de la solution du substrat. Après mélange, on lit l'absorption à 405 nm pendant 3 mn et on compare à celle d'un témoin contenant 1 ml du tampon ; on détermine alors l'augmentation par mn de la
25 densité optique " ΔA mn⁻¹".

Dans un autre essai, on place dans une semi-micro-cuvette 0,1 ml de plasma de mouton, 0,05 ml d'une solution de l'héparine témoin à puissance connue (en UI). On porte à volume final de 0,3 ml à l'aide du tampon.

30 On ajoute 0,1 ml de la thrombine. On soumet le mélange à incubation pendant 2 mn à 37°C.

On ajoute alors 0,3 ml de la solution du substrat.

Après mélange, on lit l'absorption à 405 nm,
35 et on détermine l'augmentation par mn de la densité optique " $\Delta A'$ mn⁻¹".

On répète le même essai avec chaque échantillon de fraction d'héparine à examiner, en quantité telle qu'on

obtienne à peu près une valeur correspondante de " ΔA " mn^{-1} " représentant environ 50 % de la valeur " $\Delta A \text{ mn}^{-1}$ ".

"L'activité spécifique antithrombine" (a) de l'héparine de puissance connue est ensuite calculée par
5 l'équation :

$$(a) = \frac{\Delta A - \Delta A'}{0,25} \times 1.000 .$$

"L'activité spécifique antithrombine" (a') de chaque échantillon ou fraction d'héparine examiné est calculée par l'équation :

$$(a') = \frac{\Delta A - \Delta A''}{\text{poids de l'échantillon de fraction d'héparine}} \times 1.000 .$$

Le titre de chacune des fractions examinées, exprimé en UI, est déterminé par la formule :
15 puissance de la fraction d'héparine examinée =
titre de l'héparine de titre connu $\times \frac{a'}{a}$.

D) Mesure de l'activité anticoagulante de l'héparine (ou fractions d'héparine) par la technique thrombo-élastographique.

20 Le principe de la méthode consiste à comparer les durées de coagulation mesurées sur les échantillons examinés et sur les échantillons témoins, après recalcification du contenu des tubes par addition de chlorure de calcium, selon la technique thrombo-élastographique (TEG) décrite
25 dans "Biologie des hémorragies et des thromboses", G. Raby ; Masson, Paris 1966, pages 186-188.

Cette technique tire avantage du passage de l'état liquide à l'état solide d'une préparation de sang subissant la coagulation. Le principe de la méthode consiste à soumettre
30 un récipient dans lequel on a introduit d'abord la préparation à étudier à un mouvement angulaire oscillant et à observer l'effet de coagulation sur un cylindre suspendu à l'extrémité d'un fil de torsion et plongeant dans la préparation. Lorsque la coagulation commence, le plasma contenu
35 dans le récipient confère un mouvement oscillatoire correspondant au cylindre.

15

On suit la coagulation depuis le moment ($t = 0$) où l'activation des facteurs responsables de la coagulation est induite par addition des ions Ca^{++} dans les conditions indiquées ci-dessus.

5 Dans tout ce qui suit, "r" est la durée d'induction qui précède le commencement effectif de la coagulation ; "ma" est l'amplitude maximum des oscillations du cylindre.

"k" est la durée qui s'écoule entre le moment
10 où le cylindre commence à osciller et le moment où l'amplitude du mouvement atteint 20 mm, l'essai étant conduit dans les mêmes conditions avec un plasma exempt de plaquettes, et dont la teneur en fibrinogène est normale (3 à 4 g pour 1.000).

15 Le "temps de coagulation totale" d'une préparation est constitué par la somme $r + k$.

La cinétique de la coagulation est exprimée par les paramètres "r" et " $r + k$ " et la dynamique de la coagulation par l'amplitude maximum "ma" des oscillations du cy-
20 lindre.

E) Temps de coagulation thrombine.

On ajoute 2 microgrammes de l'échantillon d'héparine à examiner dans 0,1 ml de sérum physiologique à 0,9 ml de plasma pauvre en plaquettes, fraîchement pré-
25 paré (recueilli de trois donneurs). On prélève une fraction aliquote de 0,1 ml qu'on soumet à incubation sous agitation continue à 37°C dans un bain-marie de type électromagnétique. On déclenche la coagulation par addition de 0,1 ml d'une solution de thrombine dans du sérum physiologique (à
30 environ 1 unité NIH) (unités du "National Institute of Health").

F) Temps de thromboplasmine partielle activée ou temps de Céphaline-Kaolin.

On ajoute 2 microgrammes de l'héparine examinée
35 dans 0,1 ml de sérum physiologique à 0,9 ml de plasma pauvre en plaquettes fraîchement préparé. On prélève une fraction aliquote de 0,1 ml à laquelle on ajoute 0,1 ml d'une suspension de céphaline (dilution à 1:10 dans du tampon de

Michaelis, pH 7,35, du produit lyophilisé du commerce dissous dans 20 ml d'eau distillée) et 0,1 ml de suspension de kaolin à 5 mg/ml. On soumet le mélange à incubation de 3 mn à 37°C et on ajoute 0,1 ml d'une solution 25 mM de CaCl_2 soumise à incubation préalable à 37°C. On note les temps de coagulation.

Les exemples qui suivent sont donnés en référence aux figures des dessins annexés sur lesquels :

- les figures 1 à 3 représentent les diagrammes d'élution de l'héparine selon les divers modes de réalisation du procédé selon l'invention,
- la figure 4 représente les différents diagrammes d'électrophorèse obtenus dans les conditions indiquées plus haut, d'une part, avec l'héparine du commerce et, d'autre part, avec une fraction d'héparine selon l'invention séparée de l'héparine du commerce, et
- les figures 5 à 10 illustrent les comportements comparatifs de l'héparine classique et d'une fraction d'héparine selon l'invention dans des essais *in vivo* sur des chiens et des singes.

EXEMPLE 1

On soumet une héparine obtenue à partir d'intestin de porc à fractionnement sur ULTROGEL selon l'un des modes de réalisation du procédé selon l'invention décrits plus haut.

Les résultats obtenus sont illustrés graphiquement dans la figure 1 des dessins annexés qui représente les variations de divers paramètres définis ci-après, en ordonnées, en fonction du nombre des fractions de 5 ml éluées successivement, porté en abscisses et exprimé par le nombre des tubes.

La courbe a représente la variation de la teneur en héparine dans chacun des tubes successifs, cette teneur exprimée en mg/ml ayant été déterminée par la méthode polarimétrique décrite plus haut.

La courbe b représente la variation correspondante de "l'activité spécifique anti F Xa" déterminée

sur le substrat S-2222 et

la courbe c représente les variations correspondantes de "l'activité spécifique antithrombine" déterminée sur le substrat S-2238.

- 5 Les mêmes représentations graphiques, pour les variations des mêmes paramètres, s'appliquent aux figures 2 et 3.

- 10 Les fractions LP_{11} , LP_{12} , LP_2 , LP_{31} et LP_{32} correspondent à différents groupement de tubes auxquels on a procédé selon les activités mesurées. La fraction LP_2 correspond à un groupe de fractions de 5 ml défini ci-dessus qui présente, dans les limites les plus larges, l'activité spécifique antiFXa maximale et l'activité spécifique antithrombine maximale.

- 15 Les activités anticoagulantes correspondantes dans divers essais classiques sont rapportées dans le Tableau I ci-après. Les résultats rapportés dans ce tableau montrent qu'on obtient des résultats particulièrement satisfaisants avec la fraction LP_2 .

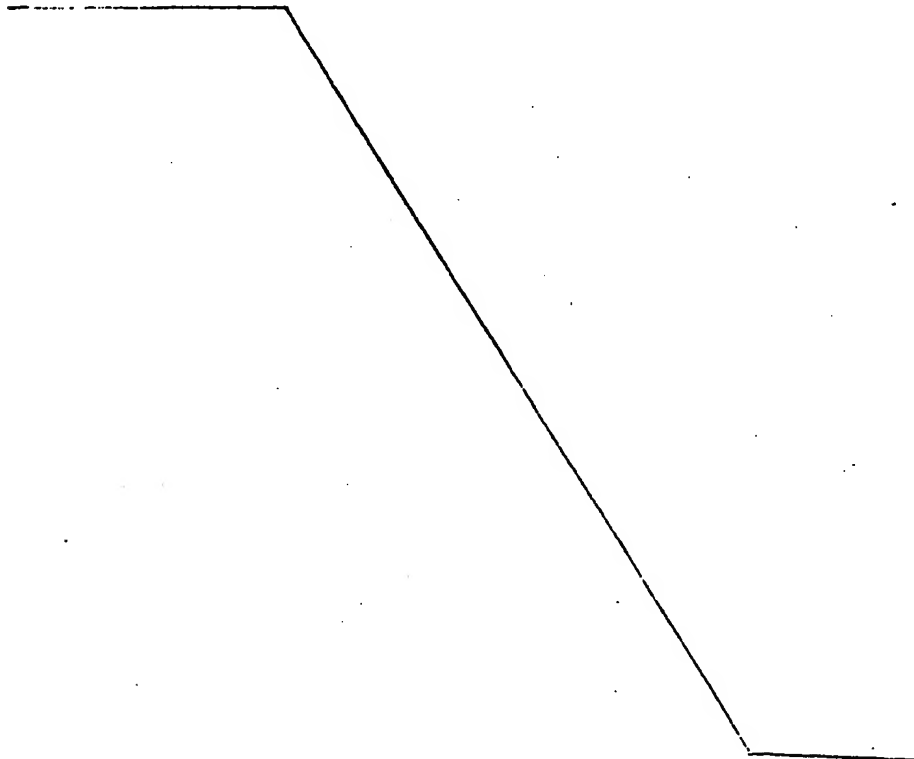


TABLEAU I

	Produit de départ	LP ₁₁	LP ₁₂	LP ₂	LP ₃₁	LP ₃₂
Poids d'héparine (mg)	650	62	33	340	126	45
Activité antithrombine (U/mg) (S-2238)		111	201	234	209	156
Activité antiFXa (U/mg) (S-2222)		202	458	455	335	111
Activité antiFXa Activité antithrombine		1,82	2,28	1,94	1,60	0,71
Poids moléculaire (chroma- tographie liquide à haute performance) (Poids mol. Poids mol.) maximum de départ (Fraction) principale	42.500 19.400	40.800	25.500	18.600	13.100	8.500
Unités Codex (U/mg) (1)	187	90	166	146	167	97
Titre selon Yin et Wessler (U/mg) (2)	117	26	126	319	79	32
Activité antiFXa (Yin et Wessler) titre USP	0,62	0,29	0,76	2,18	0,47	0,33
Temps de thrombine Témoin pour 0,2 U/ml Codex ou plasma à 0,2 U/ml	46	13 s	70 s	> 10mn	285 s	27 s
Thromboélastogramme (r + k) (mm) Sang sans héparine : t ₀ =23 Unités Codex : sang à 0,2 U/ml	30	33	46	204	>200	43

(1) Codex français (8ème édition 1965, page 560) sur plasma de mouton coagulé après recalcification.

(2) SIGMA "Bulletin technique" n° 870, janvier 1975.

EXEMPLE 2

On part d'une héparine du commerce (produit de départ du Tableau II ci-après) qu'on traite comme dans l'exemple précédent. On obtient une fraction LP_2 dont les activités sont rapportées dans la colonne "Produit de départ" du tableau II ci-après.

On traite ensuite cette fraction selon le "troisième mode de réalisation" décrit ci-dessus du procédé selon l'invention.

La figure 2 des dessins annexés représente graphiquement la variation des mêmes paramètres que dans l'exemple 1 mais cette fois en fonction des volumes élués et non des nombres de tubes.

Les courbes a et b de la figure 2 correspondent à des fractions A et B elles-mêmes obtenues en rassemblant plusieurs volumes d'élution.

Les activités de ces fractions A et B sont rapportées dans le Tableau II ci-après.

Les résultats figurant dans ce tableau et les courbes de la figure 2 des dessins annexés montrent que les fractions les plus actives sont celles qui présentent la plus forte "activité spécifique antiFXa" même lorsqu'elles ne contiennent pas les tubes qui présentent la plus forte "activité spécifique antithrombine" rassemblés dans la fraction A.

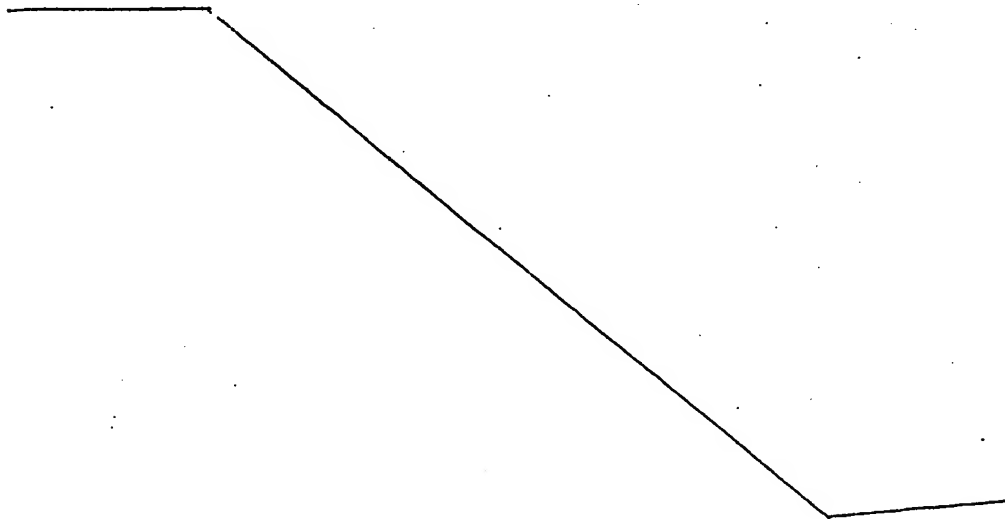


TABLEAU II

	Produit de départ	A	B
Poids d'héparine (mg)	400	210	70
Activité antithrombine (U/mg) (S-2238)	235,2	230,3	284,2
Activité antiFXa (U/mg) (S-2222)	250,2	181,7	448,4
Activité antiFXa Activité antithrombine (substrat chromogène)			
Poids moléculaire (CLHP) Poids moléculaire moyen initial	14.800	13.900	16.700
T C K Eau physiologique (témoin) 2 microgrammes du produit de départ	48 s 115 s	non dosé	260 s
Temps de coagulation à la thrombine (s) 2 microgrammes du produit de départ	43 s		>10 mn
Thrombo-élastogramme (mm) r k r + k amx	57 mm 28 mm 85 mm		269 mm non mesurable dans les conditions observées

EXEMPLE 3

On soumet un échantillon d'héparine du commerce (échantillon RB 19072 du tableau III ci-après) à fractionnement selon le "troisième mode de réalisation" du procédé selon l'invention.

5 Les courbes obtenues sont reportées sur la figure 3 des dessins annexés. Les signes // ou \ figurant sur les axes des ordonnées et sur les courbes servent uniquement à mettre en évidence l'augmentation considérable observée pour les activités de certaines des fractions, augmentation
10 qu'on n'aurait pas pu représenter sur la figure en raison de la grande échelle adoptée pour les basses activités.

On a rassemblé des volumes différents pour former des fractions RB 19067, RB 19068, RB 19069 et RB 19070. On notera que les fractions les plus actives par l'effet
15 d'inhibition sur le substrat S-2222 (RB 19070) sont essentiellement distinctes des fractions les plus actives par l'effet d'inhibition sur le substrat S-2238.

Dans le tableau III ci-après, on a rapporté les activités anticoagulantes comparatives *in vitro* de l'héparine
20 de départ (RB 19072) et de la fraction selon l'invention (RB 19070). Les abréviations utilisées dans le tableau ont les significations ci-après :

TT est le temps de thrombine mesuré,

TCK est le "temps de Céphaline-Kaolin" qui est équivalent au

25 "test de prothrombine partiellement activé" (APTT) connu.

On notera dans le Tableau III l'augmentation importante des propriétés anticoagulantes de la fraction RB 19070 par rapport à l'héparine RB 19072.

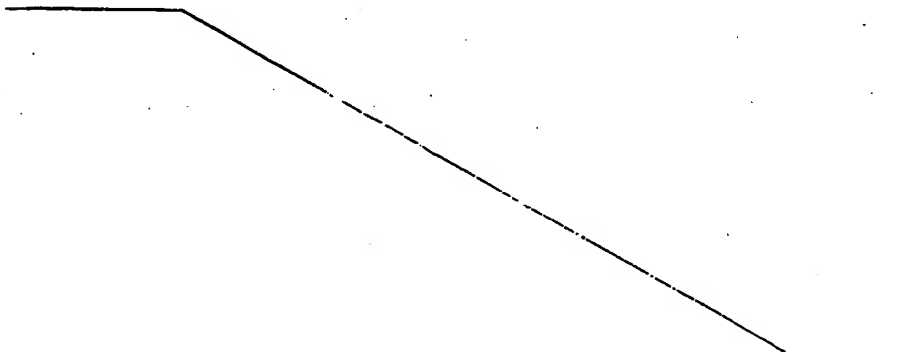


TABLEAU 1.11

	RB 19072	RB 19070
POIDS	10 g (initial)	1,575 g (obtenu)
A Antithr. (S-2238 ; u/mg)	257	332
AntiXa (S-2222 ; u/mg)	294,5	531,7
Poids moléculaire (CLPH)	14.900	19.600
Codex (UI)	186	200
Diagramme d'électrophorèse	diagramme de RP 19072 différent de celui de RB 19070	
$\text{OSO}_3^-/\text{COO}^-$	1,89	2,20
B TT (2 microgrammes/ml)(s)	45	122
TCK (2 microgrammes/ml)(s)	267	>200
TEG (2 microgrammes/ml)		
r } en mm	60	102
k } en mm	52	87
r+k }	112	139
C TEG (2 microgrammes/ml) sur sang humain entier Résultats moyens de 10 essais		
r } en mm	67	173
k } en mm	48	106
r+k }	115	250

On observe des résultats analogues *in vivo*. Dans le Tableau IV ci-après, on trouvera les résultats obtenus sur des lapins mâles selon le mode opératoire qui suit :

On a séparé des lapins mâles de Nouvelle-Zélande d'un poids moyen de 3 kg en deux groupes de chacun 4 animaux.

Au premier groupe d'animaux, on a injecté par voie intraveineuse l'héparine du commerce qui a servi de produit de départ (RB 19072) à la dose de 2,5 mg/kg, dans un volume de 2 ml.

Au second groupe d'animaux, on a administré de la même manière la fraction 19070.

On a prélevé du sang sur les animaux selon des techniques classiques 1 heure, 3 heures et 6 heures après les injections. On a ensuite procédé selon les modes opératoires habituels aux mesures du temps de coagulation à la thrombine 5 (TT), du temps Howell (TH), du temps Céphaline-Kaolin (TCK) et à des déterminations thrombo-élastographiques (TEG).

Les résultats moyens obtenus pour chacun des deux groupes sont rapportés dans le tableau IV ci-après.

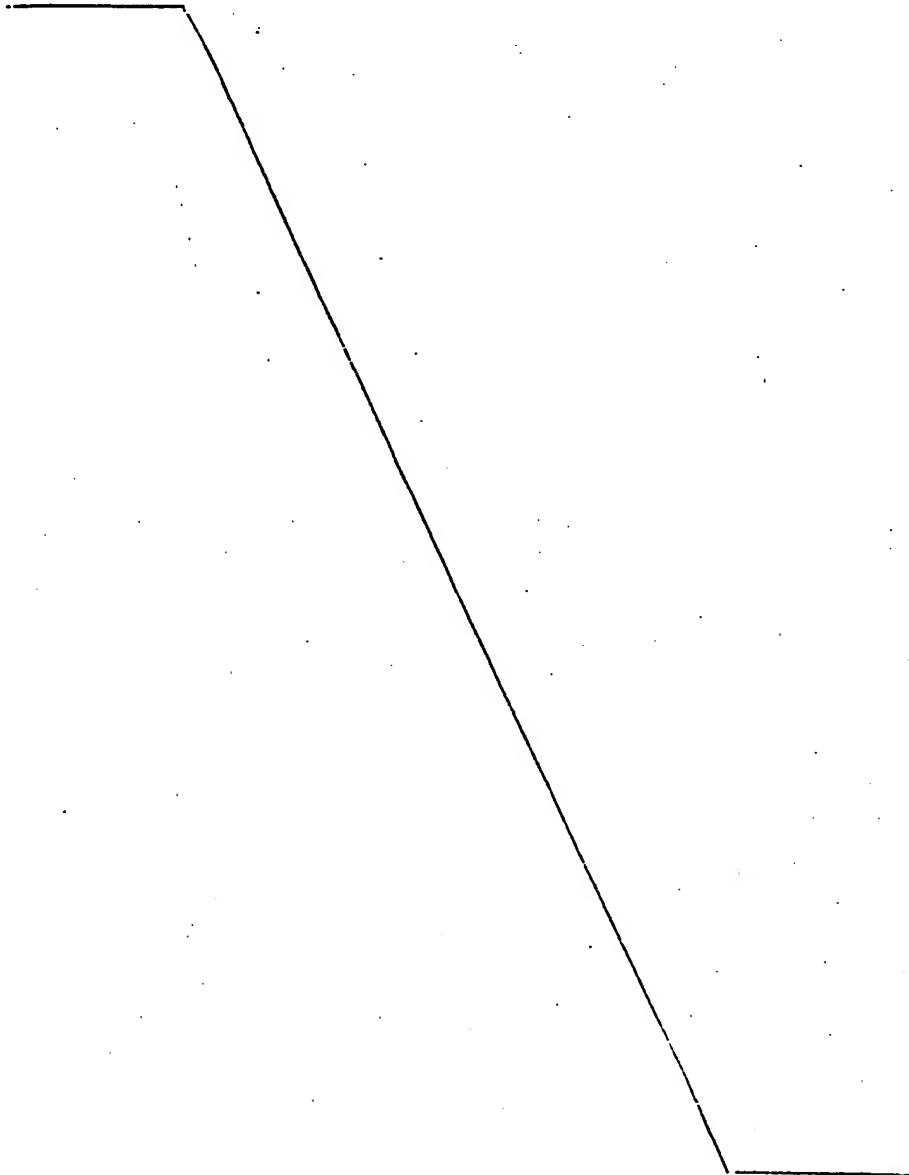


TABLEAU IV

	Initial	1 h	3 h	6 h
RB 19072				
TT (héparinémie) (u/ml)	0	0,77	0,05	0
TH (s)	129	606	156	184
TCK (s)	24	92	31	26
TEG r (mm)	12	pas encore coagulé	32	17
k (mm)	5	"	23	9
r + k (mm)	18	"	56	27
Plaquettes (nombre)	443 500	467 000	502 750	462 250
Yin et Wessler (s)	51	69	52	53
RB 19070				
TT (héparinémie) (u/ml)	0	1,15	0,65	0
TH (s)	138	> 2 044	373	159
TCK (s)	21	479	92	24
TEG r (mm)	16	pas encore coagulé	(141)	18
k (mm)	8	"	ND	10
r + k (mm)	24	"	ND	28
Plaquettes (nombre)	527 500	521 250	528 000	513 000
Yin et Wessler (s)	51	98	71	58

On peut faire les observations suivantes :

La fraction selon l'invention présente des propriétés anticoagulantes nettement supérieures à celles de l'héparine du commerce qui a servi de produit de départ, dans tous les essais considérés.

L'héparinémie est plus forte dès la première heure. La différence est encore plus forte au bout de 3 heures. Il reste très peu de l'héparine du commerce dans le sang prélevé sur les animaux 3 heures après l'injection. Par contre, des 10 proportions très substantielles des fractions selon l'inven-

tion subsistent dans les mêmes conditions (0,65 UI/ml de plasma).

Les mêmes observations s'appliquent à d'autres facteurs relatifs aux propriétés anticoagulantes. Les différences non significantes observées au niveau du TEG doivent être attribuées uniquement au fait que les durées d'observation n'ont pas été suffisamment longues dans les conditions expérimentales.

Sur des chiens, on observe des résultats analogues.

On constate en outre que contrairement à l'héparine du commerce, les fractions selon l'invention ne présentent pas d'activité thrombocytopénisante sur les plasmas d'origine humaine qui se sont avérés sensibilisés à l'héparine du commerce utilisée en thérapeutique.

On trouvera encore des différences entre les fractions selon l'invention et l'héparine du commerce dans les diagrammes d'électrophorèse tracés dans les conditions particulières spécifiées plus haut.

Ces diagrammes, différents, sont reportés sur la figure 4 des dessins annexés sur cette figure, la courbe d correspond à la fraction RB 19072 et la courbe c à la fraction RBC 19070. La flèche f indique la direction de la migration. Pour rendre visibles ces diagrammes d'électrophorèse, on a utilisé des colorants et des dispositifs photométriques (densitométriques) classiques.

AUTRES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES FRACTIONS SELON L'INVENTION.

On a procédé aux essais décrits ci-après sur une fraction appelée "fraction D" obtenue en rassemblant les fractions RB 19069 et RB 19070 de la figure 3.

1°) Affinité pour l'antithrombine III

On a mis au point des expériences de chromatographie d'affinité afin d'étudier le comportement d'affinité de la fraction D sur une colonne d'antithrombine III immobilisée sur SEPHAROSE. Cette colonne de 1,5 x 12 cm, contenant environ 10 mg de protéine par ml de la suspension finale de gel, a été équilibrée à 4°C avec du tampon au tris 0,1 M, pH 7,4, contenant NaCl à la concentration 0,2 M,

comme décrit par Höök et collaborateurs (FEBS Lett 66, 90, 1976). On a versé sur la colonne un échantillon de la fraction D (2,76 mg dans 500 microlitres de la même solution) et on a élué successivement avec des tampons contenant NaCl à la concentration 0,2 M et NaCl à la concentration 2 M. Les tubes d'effluents (1 ml) ont été soumis à des mesures polarimétriques à 365 nm, à la réaction au carbazole (détermination de poids), à des mesures de la capacité d'inhibition de la thrombine et à amidolyse catalysée par FXa des substrats chromogènes S-2238 ou S-2222 respectivement. Dans la fraction éluée avec NaCl 0,2 M, on ne trouve ni substance ni activité alors que, dans l'élution par NaCl 2 M, on retrouve totalement le poids et l'activité, aussi bien sur S-2238 que sur S-2222.

Ces résultats montrent que la fraction D, soumise à chromatographie d'affinité, se comporte comme une héparine à haute affinité.

2°) Effets d'inhibition sur les facteurs XI et XII.

On a étudié l'effet d'inhibition sur la fraction selon l'invention comparativement à celle de l'héparine classique, selon le mode opératoire ci-après :

On a mesuré dans un tube a) le temps de coagulation (mesuré par l'APTT) d'un plasma humain normal. Le résultat obtenu est exprimé arbitrairement par 100 %.

Dans un tube b), on a ajouté une certaine quantité d'un substrat formé d'un plasma humain déficient en facteur XI ou en facteur XII selon l'essai réalisé, puis la quantité Q de plasma humain normal conduisant au temps de coagulation normal (100 % du mélange à récupérer).

Dans un tube c) contenant le plasma humain déficient soit en facteur XI ou en facteur XII, on a introduit le plasma normal et une certaine quantité de la fraction selon l'invention (jusqu'à une concentration de 2 microgrammes/ml de plasma) et on a mesuré le temps de coagulation; on a exprimé le résultat en %, comparativement à la valeur de 100 % du tube terminal.

On a obtenu les résultats suivants :

	<u>APTT (s)</u>	<u>Facteur XII</u>	<u>Facteur XI</u>
Fraction D	300	29 %	33 %
Héparine	400	86 %	47 %
Plasma	29,7	100 %	43 %

5 Les résultats rapportés ci-dessus montrent que la fraction D est particulièrement active, plus que l'héparine classique, sur le facteur XII, et, dans une mesure plus limitée, sur le facteur XI. Elle est donc capable dans
10 enzymatiques sur les facteurs XI et XII qui provoquent finalement la formation de la fibrine et par suite la coagulation du plasma.

3°) Essai sur le facteur IV des plaquettes.

La fraction D n'est pas neutralisée, à une concentration à laquelle l'héparine classique est neutralisée
15 *in vitro*, par le facteur IV des plaquettes ; on peut le constater en procédant à des essais comparatifs *in vitro* : on soumet à incubation de 10 mn à 37°C des tubes contenant un plasma riche en plaquettes et 0,1 ml contenant 0,1 mg de l'une ou l'autre des fractions soumises aux essais.

20 Dans le tube contenant l'héparine classique, on ne peut pas prolonger le temps de coagulation mesuré par l'APTT ou le TT. Au contraire, dans les tubes contenant la fraction D, on constate une nette prolongation du temps de coagulation.

25 4°) Expériences *in vivo*.

On a réparti en 4 groupes de 4 animaux chacun des chiens bâtards mâles en bonne santé pesant 15 à 20 kg. On a étudié le profil de coagulation de chacun des animaux et obtenu des valeurs indicatives de base en termes de
30 temps de thromboplastine partielle activée (APTT) et temps de thrombine (TT). On a préparé dans du sérum physiologique stérile des solutions mères à 10 mg/ml d'héparine et de la fraction D. On a lentement injecté l'héparine dans la veine. Deux groupes d'animaux ont été traités par l'héparine so-
35 dique à 1,0 mg/kg et 2,5 mg/kg, les autres groupes ont été traités par la fraction D aux mêmes doses. On trouvera dans les figures 5 et 6 des dessins annexés les variations observées pour l'APTT respectivement en secondes, en fonc-

tion du temps en heures, en présence de l'héparine (courbes a) et de la fraction D (courbes b) respectivement.

On a procédé à des essais analogues sur des singes traités soit par la fraction D, soit par l'héparine classique, à des doses respectives de 1 mg/kg (figure 7) ou 2,5 mg/kg (figure 8) par voie intraveineuse, ou 2,5 mg/kg par voie sous-cutanée (figure 9) ou 5 mg/kg par voie sous-cutanée (figure 10).

Sur toutes ces figures, les courbes a représentent les effets observés sous l'action de l'héparine classique et les courbes b les effets observés sous l'action de la fraction D. Les résultats sont exprimés par les variations d'APTT (figures 7, 8 et 10) ou de TT (figure 9) en secondes, en fonction du temps en heures.

On a recueilli des échantillons de sang dans du liquide anticoagulant au citrate de sodium à 3,8 % (9 parties de sang, 1 partie de citrate de sodium) à 1, 2, 3, 4 et 6 heures d'intervalle ; on a centrifugé immédiatement à 2.500 G puis soumis immédiatement aux mesures de profil de coagulation et de teneur en héparine par les techniques au substrat chromogène (KABI, Stockholm) et au substrat fluorogène (DADE, Miami, Floride, Etats-Unis).

La figure 5 des dessins annexés représente l'action anticoagulante et la pharmacocinétique d'une dose de 1,0 mg/kg d'héparine sur des chiens, comparativement aux mêmes effets de la fraction D. Chez les animaux traités par la fraction D, on constate une augmentation de six fois des valeurs d'APTT alors que sur les animaux traités par l'héparine sodique, cette augmentation n'est que de deux fois. Dans les deux groupes, on constate une diminution des valeurs d'APTT au bout de 2 heures, mais avec la fraction D, il existe toujours un fort effet anticoagulant. Les deux groupes d'animaux retrouvent presque les niveaux d'avant traitement au bout de 5 heures.

Les résultats d'essais analogues effectués à la dose de 2,5 mg/kg sont représentés graphiquement sur la figure 6 des dessins annexés. Au bout d'une heure, aussi bien avec l'héparine sodique qu'avec la fraction D, on trouve un niveau d'APTT supérieur à 100 secondes. Au bout de deux heures, chez le groupe traité par l'héparine so-

dique, on constate une diminution marquée des niveaux d'APTT, revenant progressivement aux valeurs d'avant traitement. Les échantillons étudiés au bout de 6 heures indiquent des niveaux d'APTT presque normaux. Par contre, jusqu'à 3 heures de délai, dans le cas de la fraction D à la dose de 2,5 mg/kg, les niveaux d'APTT restent supérieurs à 100 secondes. Les chiens présentent un état d'anticoagulation (APTT supérieur à 100 secondes) pendant des durées allant jusqu'à 5 heures et présentent également des valeurs de PTT fortes et persistantes pendant des durées allant jusqu'à 10 heures. Le groupe examiné au bout de 24 heures ne manifeste presque plus d'activité anticoagulante.

On obtient des résultats analogues avec des singes ; les résultats correspondants sont illustrés sur les figures 7 à 10 des dessins annexés qui montrent que les conclusions tirées dans le cas des chiens peuvent être appliquées aux singes. Ces derniers constituent des modèles particulièrement fiables donnant des résultats qui peuvent être extrapolés raisonnablement aux humains car les réponses à l'héparinisation et l'antithrombine III sont semblables chez les humains et chez les primates, en particulier macaca mulatta.

On peut citer des conclusions analogues des pharmacocinétiques intraveineuses de la fraction D et de l'héparine classique à des doses de 0,25, 0,50, 1,0 et 2,0 mg/kg, par mesure des valeurs APTT, des temps de thrombine standardisés et des niveaux d'héparine pendant des durées allant jusqu'à 24 heures. La fraction D possède un effet anticoagulant beaucoup plus intense que l'héparine classique à toutes les posologies. La cinétique d'élimination, aux doses de 0,25 et 0,50 mg/kg est identique pour la fraction D et l'héparine classique mais la fraction D provoque une réponse anticoagulante initiale très forte alors qu'avec l'héparine classique on n'observe qu'un effet anticoagulant minime. Des études de titrage révèlent que la fraction D à une dose de 0,25 à 0,35 mg/kg donne une réponse anticoagulante identique à celle de l'héparine classique à 1,0 mg/kg. Des injections intraveineuses de 0,5 mg/mg

donnent un effet anticoagulant très prolongé. Les durées d'action de la fraction D sont les suivantes : 0,5 mg/kg = 2 à 3 heures ; 1,0 mg/kg = 5 à 6 heures et 2,0 mg/kg = 7 à 9 heures alors que les effets anticoagulants de l'héparine classique durent nettement moins longtemps.

Ces études montrent que les fractions selon l'invention constituent des médicaments anticoagulants puissants (de 3 à 5 fois plus puissants que l'héparine classique) et que leur cinétique d'élimination diffère de celle de l'héparine classique.

EXEMPLE 4 (préparation discontinue)

1. Matières premières :

10 g d'héparine sodique d'origine porcine, produit de départ, DEAE-SEPHACEL (produit du commerce) : 1 litre, équilibré dans du tampon tris-HCl 50 mM, pH 7,0, contenant 400 mM de NaCl, substrat chromogène (KABI) : S-2238 ; S-2222.

2. Conditions opératoires :

On dissout 10 g d'héparine dans un litre du tampon au tris (50 mM, pH 7,0) contenant 400 mM de NaCl et 0,02 % d'azothydrate de sodium. On met cette solution en contact avec le DEAE-SEPHACEL sous agitation. On maintient l'agitation pendant 1 heure.

On procède ensuite successivement aux éluions suivantes :

- avec le même tampon contenant 400 mM de NaCl ; volume total d'élution : 2.030 ml ; la fraction obtenue est appelée LP₁ ;
- avec le même tampon contenant 550 mM de NaCl, le volume total d'élution est de 3.465 ml ; la fraction est appelée LP₂ ;
- avec le même tampon contenant 600 mM de NaCl ; le volume total d'élution est de 2.470 ml ; la fraction est appelée LP₃ ;
- avec le même tampon contenant 1.000 mM de NaCl, le volume total d'élution est de 1.300 ml. La fraction est appelée LP₄.

Sur ces diverses fractions, on procède aux

essais ci-après :

- détermination de l'activité inhibitrice sur l'amidolyse catalysée par FXa du substrat S-2222, comme décrit dans la publication précitée; les activités inhibitrices sont
- 5 déterminées sur la fraction avant concentration ;
- mesures de coagulation du sang :
 TT (temps de coagulation à la thrombine) et
 APTT (temps Céphaline-Kaolin).

Ces essais sont effectués sur les éluats précipités par 1,5 volumes d'éthanol par volume d'éluat. Les précipités sont recueillis par filtration sur des disques de verre fritté (n° 4), puis lavés successivement à l'acétone et à l'éther. Les produits obtenus sont séchés sous vide. Ils contiennent encore de 5 à 10 % de NaCl. Les poids obtenus

15 sont les suivants :

LP₁ : 1,940 g
 LP₂ : 4,460 g
 LP₃ : 1,600 g (*)
 LP₄ : 1,500 g (*)

- 20 (*) Ces deux préparations ont été dialysées pendant 24 heures contre de l'eau distillée puis lyophilisées. Elles ne contiennent plus de sels à l'analyse.

EXEMPLE 5

A. Matières premières.

- 25 Colonne de K100/100 en DEAE-SEPHACEL (produit du commerce) aux caractéristiques ci-après :
- Dimensions du volume utile de la colonne : 10 x 62 cm
 Volume de gel : 4.870 ml
 Vitesse d'écoulement linéaire : 10 cm/h
- 30 Volume mort (volume utile de la colonne - volume de gel) : 4.100 ml
- Tampons :
- a) tampon au tris 50 mM, 400 mM de NaCl, 0,02 % d'azothydrate de sodium, pH 7,0 ; en abrégé ci-après "tampon
- 35 0,4 M" ;
- b) tampon au tris 50 mM, 600 mM de NaCl, 0,02 % d'azothydrate, pH 7,0, en abrégé ci-après "tampon 0,6 M" ;
- c) tampon au tris 50 mM, 650 mM de NaCl, 0,02 % d'azothydrate, pH 7,0, en abrégé ci-après "tampon 0,65 M",

d) tampon au tris 50 mM, 1.000 mM de NaCl, 0,02 % d'azothhydrate, pH 7,0, en abrégé ci-après "tampon 1 M".

L'héparine du commerce pour usage pharmaceutique.

B. Conditions opératoires

5 On dissout 60 g d'héparine dans 500 ml de tampon 0,4 M et on verse la solution sur la colonne. On fait passer ensuite sur la colonne, successivement à l'aide d'une pompe, les volumes de tampons ci-après :

- 2.000 ml du tampon 0,4 M
- 10 6.500 ml du tampon 0,6 M
- 4.500 ml du tampon 0,65 M
- 6.600 ml du tampon 1M.

Les volumes successifs d'élution sont les suivants :

- 15 1. de 0 à 4.100 ml : "volume mort" à rejeter,
- 2. de 4.100 à 6.600 ml : fraction 0,4 M, appelée LP₁,
- 3. de 6.600 à 13.100 ml : fraction 0,6 M, appelée LP₂,
- 4. de 13.101 à 17.600 ml : fraction 0,65 M, appelée LP₃,
- 5. de 17.601 à 18.100 ml : fraction 1 M, appelée LP₄₁,
- 20 6. de 18.101 à 18.600 ml : fraction 1 M, appelée LP₄₂,
- 7. de 18.601 à 19.100 ml : fraction 1 M, appelée LP₄₃,
- 8. de 19.101 à 19.600 ml : fraction 1 M, appelée LP₄₄.

Les fractions 1M sont les fractions les plus actives. Dans certaines circonstances, la toute dernière fraction, LP₄₄, est moins active et peut être rejetée.

Les fractions selon l'invention possèdent des applications thérapeutiques extrêmement intéressantes dans le contrôle de la coagulation, dans toutes les circonstances où l'utilisation de l'héparine est recommandée. En raison de leur forte activité, les fractions selon l'invention peuvent être utilisées en quantité plus faible et les intervalles séparant les injections peuvent être allongés. Ces fractions sont particulièrement utiles pour des patients chez lesquels on observe une activation de la coagulation, souvent spontanée, susceptible de se transformer en un état d'hypercoagulation impliquant la présence de thrombine dans le système circulatoire, avec thrombose apparente ou non.

L'invention comprend également, dans son cadre le plus général, les divers dérivés utiles des fractions selon l'invention, en particulier leurs sels métalliques, à la fois des sels simples comme les sels de sodium, de potassium, de calcium ou de magnésium, et des sels mélangés contenant au moins deux des cations métalliques mentionnés ci-dessus dans des proportions relatives quelconques.

L'invention comprend également des préparations pharmaceutiques dans lesquelles ces fractions sont associées à un véhicule pharmaceutique, en particulier des solutions stériles pour l'injection sous-cutanée ou intraveineuse, contenant une dose de la fraction selon l'invention permettant de provoquer une hypocoagulation ou une anticoagulation chez l'homme.

15 L'invention concerne également les solutions stériles pour inhalation pour traiter les maux de tête. Elle concerne également d'autres formulations pharmaceutiques telles que les suppositoires ou liposomes.

Il est clair que dans chaque cas, la posologie efficace doit être réglée par le praticien selon la pathologie particulière ou l'état de santé général du patient traité. Par suite, les intervalles donnés ci-après pour les posologies quotidiennes constituent uniquement une indication préalable à l'usage de la fraction selon l'invention. On 25 peut observer des posologies quotidiennes allant de 0,075 à 0,60 mg/kg, ce qui peut être effectué en une à six administrations par voie intraveineuse ou en une à trois administrations par voie sous-cutanée ou sous la forme de liposomes.

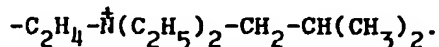
En ce qui concerne les solutions stériles pour 30 inhalation, la posologie est de 2 à 5 mg, une ou deux fois par semaine.

REVENDEICATIONS

1. Fraction d'héparine possédant des propriétés anticoagulantes, caractérisée en ce qu'elle a été obtenue à partir d'une préparation d'héparine contenant des espèces moléculaires dont les poids moléculaires vont de 5.000 à 50.000 par un procédé qui comprend la mise en contact avec une résine anionique d'une solution de ladite préparation d'héparine dans une solution aqueuse tamponnée à un pH de 6,5 à 7,5 et contenant un sel qui confère à ladite solution tamponnée une force ionique inférieure à celle d'une solution tamponnée correspondante de NaCl 0,6 M, l'élution à partir de ladite résine des fractions d'héparine éluables par ladite solution tamponnée exempte d'héparine et présentant une force ionique inférieure à celle de ladite solution tamponnée de NaCl 0,6 M, puis l'élution de la fraction encore fixée avec une solution tamponnée correspondante présentant une force ionique supérieure à celle de ladite solution tamponnée de NaCl 0,6 M.

2. Fraction d'héparine selon la revendication 1, caractérisée en ce que la résine anionique comprend un squelette de cellulose ou de dextrane portant des groupes aminoalkyle ou aminohydroxyalkyle.

3. Fraction d'héparine selon la revendication 1, caractérisée en ce que la résine anionique comprend un squelette de cellulose ou de dextrane portant des groupes diaminoéthyle de structure $-C_2H_4-\dot{N}(C_2H_5)_2$ ou diéthyl-2-hydroxypropylammonium de structure :



4. Fraction d'héparine selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'on part de 10 ml d'une solution contenant 1 g d'héparine du commerce dans une solution tamponnée (0,05 M en phosphate; pH : 6,8; 0,4 M en NaCl), on verse ces 10 ml de solution sur une colonne de ladite résine (hauteur : 28 cm ; diamètre : 2 cm) équilibrée par ladite solution tamponnée, on développe par chromatographie cette solution de départ d'héparine à l'aide de la même solution tamponnée à une vitesse d'élution de 36 ml/h à une température de 4°C, on sépare et on rejette les 500 premiers ml de liquide élué, puis on augmente progressivement la concentra-

tion en NaCl de l'éluant depuis 0,4 jusqu'à 1,4 M au cours de l'élution des 800 ml suivants environ de solution éluée, et on recueille les fractions d'héparine recherchées dans ces fractions éluées dont la concentration en NaCl est supérieure à 0,65 M.

5. Fractions d'héparine selon la revendication 4, caractérisées en ce qu'elles consistent essentiellement en les fractions éluées dont la concentration en NaCl va de 0,70 à 0,90 M.

10 6. Fraction d'héparine selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle a été obtenue à partir de 30 ml d'une solution de départ contenant 10 g d'une héparine du commerce (50 mM de tris ; 0,02 % d'azothhydrate de sodium ; pH 7,0, concentration initiale en NaCl : 0,4 M) en versant
15 ces 30 ml de solution sur une colonne de ladite résine (diamètre : 18 cm ; hauteur : 6,8 cm) équilibrée par ladite solution tamponnée, en soumettant cette solution initiale d'héparine à développement chromatographique à l'aide de la même solution tamponnée à une vitesse d'élution de 75 ml/h
20 à la température de 4°C, en séparant et en éliminant les 300 premiers ml de liquide élué puis en augmentant progressivement la concentration en NaCl de l'éluant depuis 0,4 M jusqu'à 1,0 M à une vitesse réglée de manière à atteindre la limite supérieure 24 heures plus tard et en re-
25 cueillant les fractions d'héparine recherchées contenues dans les fractions éluées d'héparine dont la concentration en NaCl est d'au moins 0,55 M.

7. Fraction d'héparine selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle consiste essentiellement en les
30 fractions éluées dont la concentration en NaCl est au moins 0,59 M.

8. Fractions d'héparine selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles ont été obtenues à partir d'une solution initiale de 650 mg d'héparine (présentant de pré-
35 fférence une activité d'environ 160 ± 20 U/mg et des poids moléculaires d'environ 5.000 à 50.000) en solution dans 2 ml de solution aqueuse tamponnée (0,3 M en NaCl ; pH 6,8), en versant ces 2 ml de solution sur une colonne de gel "ULTROGEL ACA 54" de 2,6 x 100 cm équilibrée par le même tampon, en

soumettant cette héparine de départ à développement chromatographique à l'aide de la même solution tamponnée à une vitesse d'élution de 20 ml/h à une température de 4°C, en séparant le liquide élué en fractions successives de 5 ml et en
5 recueillant les fractions d'héparine recherchées qui sont contenues dans lesdites fractions de 5 ml allant de la 53ème à la 86ème.

9. Fraction d'héparine selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle a été obtenue par une combinaison des procédés selon la revendication
10 1 et la revendication 8.

10. Fraction d'héparine selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle présente une activité d'au moins 300 u/mg dans la diminution de la
15 vitesse d'hydrolyse *in vitro* d'un substrat formé de benzoyl-isoleucine-acide glutamique-glycine-arginine-p-nitranilide, HCl (substrat S-2222) par le facteur Xa préparé par activation du facteur X en présence d'antithrombine III et de ladite fraction d'héparine.

20 11. Fraction d'héparine selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle présente une activité d'au moins 450 u/mg dans la réduction du substrat S-2222.

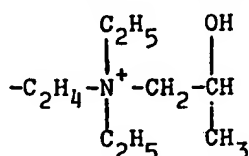
12. Fraction d'héparine selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle présente une activité d'au
25 moins 500 u/mg dans la réduction du substrat S-2222.

13. Fraction d'héparine selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle présente une activité *in vitro* inférieure à 400 u/mg dans la diminution de la
vitesse d'hydrolyse d'un substrat formé de H-D-phénylalanine-
30 L-pipecolyl-L-arginine-p-nitranilide, diHCl par la thrombine en présence d'antithrombine III et de ladite fraction d'héparine.

14. Fraction d'héparine selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que :
35 - elle est fixée pratiquement en totalité par l'antithrombine III,
- elle inhibe en partie au moins les facteurs XI et XII du sang,
- elle n'est pas fortement inhibée par le facteur IV des
40 plaquettes,
- elle n'exerce pas d'action thrombocytopénique.

15. Fraction d'héparine à hautes propriétés anti-coagulantes et caractérisée en ce que :

- elle est fixée sur une résine à squelette de cellulose ou de dextrane portant des groupes diaminoéthyl- $\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ ou
- 5 des groupes diéthyl-2-hydroxypropyl-ammonium de structure :



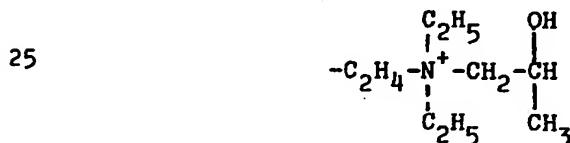
- 10 lorsqu'elle est sous la forme de solution tamponnée à pH 6,5-7,5 contenant NaCl à une concentration inférieure à 0,6 M,
- elle présente une activité d'au moins 300 u/mg dans la diminution de la vitesse d'hydrolyse *in vitro* d'un substrat formé de benzoyl-isoleucine-acide glutamique-
- 15 glycine-arginine-p-nitranilide, HCl (substrat S-2222) par le facteur Xa préparé par activation du facteur X en présence de l'antithrombine III et de ladite fraction d'héparine ;
- elle est formée d'espèces chimiques dont les poids moléculaires vont de 17.000 à 25.000, tels que déterminés par
- 20 les durées de rétention mesurées dans la chromatographie liquide à haute performance, comparativement à celles obtenues dans des conditions identiques d'élution avec des polystyrène-sulfonates de sodium présentant des poids
- 25 moléculaires étalons de 1.600, 4.000, 6.500, 16.000, 31.000, 65.000 et 88.000 respectivement ;
- elle est fixée pratiquement en totalité par l'antithrombine III ;
- elle inhibe en partie au moins les facteurs XI et XII du
- 30 sang ;
- elle n'est pas fortement inhibée par le facteur IV des plaquettes ;
- elle n'exerce pas d'action thrombocytopénique.

16. Fraction d'héparine selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle contient des groupes glucosamine en partie à l'état de sulfates de N-glucosamine, le reste de ces groupes glucosamine étant sous la forme de groupes

N-acétylglucosamine, selon les spectres de résonance magnétique nucléaire.

17. Procédé de préparation d'une fraction d'héparine selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que l'on met en contact avec une résine anionique une solution d'une préparation d'héparine contenant des espèces chimiques dont les poids moléculaires vont de 5.000 à 50.000 sous la forme d'une solution aqueuse tamponnée à un pH de 6,5 à 7,5 et contenant un sel qui confère à ladite solution tamponnée une force ionique inférieure à celle d'une solution tamponnée correspondante de NaCl 0,6 M, on élue de ladite résine les fractions d'héparine éluables à l'aide de la solution tamponnée ci-dessus exempte d'héparine et présentant une force ionique inférieure à celle de ladite solution tamponnée de NaCl 0,6 M puis on élue la fraction encore fixée à l'aide d'une solution tamponnée correspondante présentant une force ionique supérieure à celle de ladite solution tamponnée de NaCl 0,6 M.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que la résine anionique comprend un squelette de cellulose ou de dextrane portant des groupes diaminoéthyle $C_2H_4\overset{+}{N}H(C_2H_5)_2$ ou des groupes diéthyl-2-hydroxypropylammonium de structure :



19. Composition thérapeutique possédant des propriétés anticoagulantes et caractérisée en ce qu'elle contient une dose efficace d'une fraction d'héparine selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 en association avec un véhicule pharmaceutique.

20. Composition thérapeutique selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle est sous la forme d'une solution stérile injectable.

21. Composition pharmaceutique selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle est sous forme de liposomes.

22. Composition pharmaceutique selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle est sous la forme d'un suppositoire.

5 23. Composition pharmaceutique selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle est sous forme d'une solution stérile pour inhalation.

Fig.1.

